

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

ANNÉE SCOLAIRE 1924-1925. — N° 2

ÉTUDE
SUR LA COLORATION
DU SÉRUM NORMAL
DE CHEVAL.

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 8 Novembre 1924

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR LE

Docteur GASTON ROUSSEL

VÉTÉRINAIRE

Né le 1^{er} Décembre 1877, à Auxonne (Côte-d'Or)



PARIS
IMPRIMERIE DE COSTER

11, RUE DE TANGER, 11

1924



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553203_0069

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE LYON

ANNÉE SCOLAIRE 1924-1925. — N° 2

ÉTUDE
SUR LA COLORATION
DU SÉRUM NORMAL
DE CHEVAL

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Et soutenue publiquement le 8 Novembre 1924

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR VÉTÉRINAIRE

PAR LE

Docteur GASTON ROUSSEL

VÉTÉRINAIRE

Né le 1^{er} Décembre 1877, à Auxonne (Côte-d'Or)



PARIS
IMPRIMERIE DE COSTER

11, RUE DE TANGER, 11

1924

PERSONNEL ENSEIGNANT A L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE DE LYON

Directeur M. F.-X. LESBRE.

Professeur honoraire . . . M. Alfred FAURE, ancien directeur.

PROFESSEURS

Physique et Chimie médicale, Toxicologie.	MM. PORCHER.
Botanique médicale et fourragère, Zoologie médicale, Parasitologie et Maladies parasitaires	MAROTEL.
Anatomie descriptive des animaux domestiques, Tératologie. Exté- rieur	LESBRE. JUNG.
Physiologie. Thérapeutique générale Matière médicale.	
Histologie et Embryologie. Anatomie pathologique. Inspection des denrées alimentaires et des établissements classés soumis au contrôle vétérinaire	BALL.
Pathologie médicale des Equidés et des Carnassiers. Clinique. Sémiologie et Propédeutique. Jurisprudence vétérinaire.	CADEAC.
Pathologie chirurgicale des Equidés et des Carnassiers. Clinique. Anatomie chirurgicale. Médecine opératoire.	DOUVILLE.
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire. Clinique. Médecine opératoire. Obstétrique	CUNY.
Pathologie générale et Microbiologie. Maladies microbiennes et police sanitaire. Clinique.	BASSET.
Hygiène et Agronomie. Zootechnie et Economie rurale.	BOUCHER.

CHEFS DE TRAVAUX

MM. PORCHEREL,
AUGER.
LOMBARD.

MM. TAPERNOUX.
TAGAND.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

Président : M. le D^r F. ARLOING, Professeur de Médecine expérimentale et comparée
et de Bactériologie à la Faculté de Médecine, Correspondant national de l'Académie
de Médecine, Chevalier de la Légion d'Honneur.

Assesseurs : M. BALL, Professeur à l'Ecole Vétérinaire de Lyon.

M. BASSET, Professeur à l'Ecole Vétérinaire de Lyon.

La Faculté de Médecine et l'Ecole Vétérinaire déclarent que les opinions émises
dans les dissertations qui leur sont présentées doivent être considérées comme propres
à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni approbation ni improbation.

ETUDE
SUR LA COLORATION
DU SÉRUM NORMAL
DE CHEVAL

A LA MÉMOIRE

de mon ancien Maître, M. le Professeur S. ARLOING

Directeur de l'Ecole Vétérinaire de Lyon

*Professeur de Médecine expérimentale et comparée
à la Faculté de Médecine de Lyon*

Correspondant de l'Institut

Associé national de l'Académie de Médecine

Commandeur de la Légion d'Honneur

A MES ANCIENS MAÎTRES LYONNAIS

ETUDE SUR LA COLORATION DU SÉRUM NORMAL DE CHEVAL

CHAPITRE I

Connaissances actuelles de la question

Coloration du sérum normal de cheval.....	13
Quelle est la cause de la coloration?.....	15
Les pigments biliaires dans le sérum.....	18
Bilirubine.	18
Urobiline.	23

CHAPITRE II

Recherches personnelles

I. — Relation entre la coloration du sérum et la présence de la bilirubine.....	26
II. — Influence du nombre de saignées sur la coloration du sérum.....	31
III. — Influence de l'âge du sérum sur sa décoloration	39
IV. — Sous quelle influence se produit la décoloration du sérum?	41
Influence de la lumière.....	41
— de l'air	43
— de l'oxygène	45
V. — Influence des radiations lumineuses sur la coloration du sérum.....	46
VI. — Influence des rayons ultra-violet sur la coloration du sérum.....	51
VII. — Influence de la chaleur sur la coloration du sérum.	53
VIII. — Décoloration du sérum coagulé.....	58
IX. — Action de l'acide trichloracétique :	
sur le sérum de cheval.....	59
sur le sérum d'autres animaux.....	61
Conclusions générales	63

CHAPITRE I

CONNAISSANCES ACTUELLES DE LA QUESTION

Coloration du sérum normal de cheval

Un sérum normal, récolté aseptiquement, est d'une teinte jaune plus ou moins accusée, vu sous une épaisseur d'environ 15 à 20 millimètres, c'est-à-dire la largeur habituelle d'un tube à essai ou d'une ampoule.

Cette teinte varie d'intensité suivant les sujets saignés; il y a là des questions individuelles qu'il est impossible de prévoir et nous n'avons aucune donnée précise quant à leur déterminisme. Ces différences individuelles sont connues chez l'homme; c'est ainsi que, chez les Orientaux, la teinte du sérum est en général plus foncée que chez les Occidentaux; il paraît y avoir, aussi une relation entre la coloration du sérum et celle de la peau. Chez le cheval, il n'a jamais été fait de remarques de cet ordre; il serait possible, cependant, que des observations suivies dénotent quelque différence entre les sérums d'animaux très foncés de robe et les chevaux gris; cette question serait alors liée sans doute à celle de la production des mélanines, sous l'influence de la tyrosinase.

Parfois, le sérum est d'une teinte jaune très pâle. Cette hypocoloration a été signalée par Hayem dans les anémies et la chlorose; on l'observe aussi dans les maladies consomptives et cachectisantes, dans la tuberculose en particulier.

Le sérum devient parfois laiteux. Dans d'autres cas, il est verdâtre ou d'un jaune verdâtre plus ou moins foncé.

Lorsque des fautes de technique ont été commises dans la récolte du sérum, étant donné que, dans la pratique, le sérum.

est décanté dans les quatre jours qui suivent la saignée, il prend une teinte plus ou moins rouge par suite de la dissolution de l'hémoglobine. Cette dissolution peut être un phénomène d'hémolyse tenant à la contamination du sang par des bactéries ou un phénomène physique dû à d'autres causes parmi lesquelles nous citerons l'agitation pendant la coagulation, la présence d'eau dans les conserves, le retard apporté à la décantation du sérum, etc... Le sérum peut être aussi de teinte rouge lorsqu'il a été décanté maladroitement; et qu'une quantité notable de globules du sang y restent en suspension.

L'addition au sérum de certains produits destinés à assurer sa conservation, peut modifier sa teinte, en général, dans ces cas, il devient fluorescent.

Le vieillissement du sérum atténue la belle teinte jaune qu'il possède lorsqu'il est fraîchement récolté. Au bout de plusieurs mois, il pâlit; il n'est pas rare de voir certains sérums très vieux n'avoir plus qu'une teinte jaune très pâle, parfois même légèrement rosée.

Le chauffage change la coloration. Lorsqu'on reste à des températures de chauffage ne dépassant pas 56°, l'atténuation de la teinte, tout en étant sensible, n'est pas encore très marquée. Au fur et à mesure qu'on s'approche de la température de coagulation, le sérum devient de plus en plus opalescent, jusqu'à l'opacité complète. Il y a dans ces cas des différences individuelles très marquées.

J'en ne ferai que citer les modifications de couleur du sérum dues à des altérations. Pendant sa récolte, le sérum peut être contaminé par des bactéries ou plus fréquemment, par des moisissures. Certaines de ces moisissures poussent en touffes, et ne changent en rien la couleur du sérum; d'autres la modifient profondément et le rendent gris brun ou noirâtre. Il en est de même de certaines bactéries qui, si elles sont chromogènes, changent en très peu de temps la couleur du sérum. Par exemple, la contamination par le bacille pyocyanique, le rend brun-noirâtre et, si on agite le tube, le sérum devient immédiatement bleu-verdâtre.

Quelle est la cause de la coloration du sérum?

Pendant longtemps, on a désigné la matière colorante du sérum sous le nom de « *lipochrome* », « *sérochrome* » ou « *lutéine* », sans connaître les relations que cette matière pouvait avoir avec les matières colorantes du jaune d'œuf, des graines ou les pigments biliaires. On désignait sous le nom d'hyper ou d'hyposérochromie, les variations de quantité de cette matière.

Daremberg prétendait qu'en centrifugeant le sang pendant une heure on obtenait un sérum aussi limpide que de l'eau, à condition que le sang soit turbiné rapidement après la saignée. Lorsqu'on centrifuge du sang défibriné, disait-il, on ne peut obtenir du sérum sans globules rouges. Il concluait que les sérums de cheval, de bœuf, de chien et de lapin, ne doivent leur coloration qu'à des globules sanguins flottant dans le liquide et qu'il n'y a pas de matière colorante dissoute. Gilbert et Herscher s'inscrivent en faux contre cette opinion, disant qu'ils ont centrifugé de nombreux sérums pendant un temps considérable, et que ces sérums n'ont jamais perdu leur teinte.

Dor, opérant sur de la sérosité ascitique, tire la conclusion que le sérochrome est avide d'oxygène, que sous son influence, il se décolore, et que sous l'influence de la lumière, il s'oxyde. Nous verrons que ces conclusions sont parfaitement exactes pour le sérum.

*
**

Nous savons, aujourd'hui, que la coloration du sérum est due à la présence de faibles quantités de bilirubine.

Hammarsten considère les pigments biliaires comme une partie constituante du sérum de cheval d'où il a pu isoler la bilirubine en cristaux, 17 fois sur 20.

Les travaux de Gilbert, Herscher et Posternak montrent que, dans la réaction de Hayem, la formation d'un anneau bleu est due à la présence de bilirubine et ils n'ont pu l'obtenir avec l'hémoglobine, l'albumine, l'indican et les lipochromes. Dans les cas où l'on obtient cet anneau bleu, on peut faire ressortir dans le coagulum la série des anneaux caractéristiques de la réaction

de Gmelin il suffit de pratiquer la réaction dans un grand verre sur du sérum dilué de 1 à 2 volumes d'eau, pour favoriser la diffusion de l'acide. L'intensité de la réaction de Gmelin est proportionnelle à la teinte des sérums, exception faite pour les sérums lactescents et les sérums hémoglobiniques.

Ces mêmes auteurs ont pu concentrer la matière colorante de la façon suivante: on traite 2 volumes de sérum par un mélange de 1 volume de chloroforme et 2 volumes d'alcool à 95°; l'albumine est précipitée par l'alcool et la matière colorante se dissout dans le chloroforme. On filtre, on lave à plusieurs reprises avec un mélange alcool-éther, on ajoute lentement et en agitant, de l'eau au liquide filtré. Le chloroforme se sépare plus ou moins jaune, mais ayant concentré la matière colorante. S'il est trouble, il se clarifie en 6 à 12 heures; s'il y a des graisses on ajoute quelques gouttes d'alcool et le liquide devient limpide.

Un auteur italien, Zoja, avait prétendu que la matière colorante du sérum était de la lutéine. Cette lutéine existe dans le sérum des Oiseaux; mais Gilbert et Herscher ont démontré que cette substance, mal définie, n'intervient pas dans la coloration du sérum. Ils ont repris l'étude des réactions de Zoja et ont constaté que, en réalité, ses réactions témoignent de la présence de la bilirubine.

Il ne paraît pas douteux que la matière colorante du sérum de cheval soit la bilirubine.

La quantité de cette substance, contenue dans le sérum, est assez faible. On a constaté la présence, chez les animaux, des quantités suivantes:

Cheval..	1 gramme de bilirubine pour	7.950 c.c. de sérum		
Pigeon..	—	—	11.450	—
Bœuf....	—	—	13.000	—
Porc.....	—	—	18.000	—
Poule....	—	—	20.000	—
Canard...	—	—	24.000	—

A. Ranc, sur les conseils de Dastre, reprit la question de la coloration du sérum de cheval. Il recueille le sang dans un vase contenant 2 grammes d'oxalate de soude et 50 c.c. d'une solution physiologique de chlorure de sodium à 7,50 pour 1.000, le tout

pour 1.000 c.c. de sang. On laisse reposer, on décante et on centrifuge; on obtient alors un liquide jaune ambré. Ranc a pu obtenir ainsi, par précipitation par l'alcool et dissolution dans le chloroforme, un précipité de bilirubine. Cette bilirubine est analogue à celle qui est préparée à partir des calculs biliaires; elle a le même aspect, ses solutions chloroformiques sont les mêmes et elle donne les mêmes réactions avec les carbonates alcalins, l'acide nitrique fumant, la solution d'iode et l'acide diazosulfanique. Cet auteur a recherché si, dans le sérum, existaient d'autres substances pouvant le colorer. Il démontra que, seule, la bilirubine était en cause, par un certain nombre d'expériences :

a) Au sérum obtenu, il ajoute 2 fois son volume d'alcool à 95° puis du chlorure de calcium en solution à 10 pour 100. Il se forme un précipité jaune de bilirubinate de calcium mélangé aux sels de calcium des autres pigments biliaires. La liqueur surnageante est incolore, et la formation d'un composé calcique insoluble est un caractère des matières colorantes biliaires, ce qui les différencie des lutéines.

b) Le mélange chloroforme alcool, d'où s'est précipitée la bilirubine est encore coloré en jaune vert. Si on l'étend d'eau distillée et qu'on agite avec du chloroforme, celui-ci prend la coloration, et il la cède à une solution étendue de carbonate de soude. Cette réaction est propre aux pigments biliaires.

c) Le mélange chloroforme alcool, jaune vert, contient des produits d'oxydation de la bilirubine. Si on réduit par un courant d'hydrogène sulfuré, on ramène le liquide à la teinte jaune d'or de la solution de la bilirubine. Ce processus d'oxydation et de réduction est caractéristique de la bilirubine;

d) Le précipité des matières albuminoïdes du sérum entraîne mécaniquement un peu de la matière colorante. Si on le sèche sur le vide, et qu'on le lave avec de l'alcool, jusqu'à ce que le liquide ne soit plus coloré, on obtient les albuminoïdes entièrement blancs.

Il y a donc bien, dans le sérum, de la bilirubine, à l'exclusion d'autres matières colorantes.

Les variations de la quantité de bilirubine du sérum ne sont pas connues chez le cheval. Chez l'homme, l'hypochoémie est en relation avec les anémies accusées, le cancer et la tuberculose;

l'hypercholémie est fréquente dans la néphrite interstitielle, la cirrhose hypertrophique, les ictères, l'obstruction du cholédoque.

Il y aurait matière à une étude suivie des variations de la bilirubine du sérum dans certaines affections du cheval.

Les pigments biliaires dans le sérum

LEUR RECHERCHE

Puisque toute la question de la coloration du sérum que nous avons envisagée se résume à la présence des pigments biliaires, je rappellerai quels sont les moyens de les mettre en évidence.

On sait que le pigment fondamental de la bile est un pigment jaune orangé, appelé la bilirubine, de laquelle dérivent tous les autres pigments :

a) par réduction, la bilirubine donne de l'urobiline, très rare dans les sérums ;

b) par oxydation, elle donne de la biliverdine (verte), de la bilicyanine (bleue), de la bilipurpurine (rouge), et de la cholétéline (jaune) ;

c) par hydratation simple, on obtient de la bilifuscine ;

d) par hydratation et oxydation, de la biliprazine ;

e) par réduction et hydratation, de l'hydrobilirubine.

Nous ne dirons rien des différentes bilirubines, cela nous entraînerait beaucoup trop loin ; ceux que la question intéresserait, trouveront les documents nécessaires dans la thèse de Piettre.

Je n'envisagerai que les procédés de recherche concernant la bilirubine et l'urobiline.

BILIRUBINE

Réaction de Gmelin. — Cette réaction est basée sur ce fait que la bilirubine traitée par un oxydant, acide nitrique nitreux, dans l'espèce, se transforme en de nouveaux corps que nous venons d'énumérer plus haut. On obtient, par le mélange des

solutions, les diverses teintes ou la superposition des teintes si on les met seulement en contact.

Réactif nitreux nitrique.

Gilbert et Herscher se servent du réactif suivant :

Acide nitrique pur à 36°.....	200 c.c.
Eau distillée	100 c.c.
Nitrite de soude.....	0,60 gr.

Réaction de Hayem. — Cette réaction est une modification de celle de Gmelin. Dans un tube cylindrique à fond plat, de 1 cm. de diamètre, on met le sérum et on ajoute, à l'aide d'une pipette effilée, de l'acide nitrique nitreux. Il se produit au contact, un coagulum qui présente une zone supérieure blanche et une inférieure, jaune. A l'union de ces deux zones, apparaissent les phénomènes colorés. S'il y a de la bilirubine, il se forme un liseré bleu à reflets verdâtres qui finit par disparaître.

Réaction de Grimbert. — On prend 10 c.c. de sérum et on ajoute 5 c.c. d'une solution de chlorure de baryum à 10 p. 100. On agite, on filtre, on lave à l'eau distillée, on perce le filtre au fond et on entraîne le précipité resté sur le filtre par 5 c.c. d'alcool à 90°, renfermant 5 pour 100 d'acide chlorhydrique. On porte quelques instants au bain-marie bouillant. L'alcool qui surnage est vert-bleu, s'il y a des pigments biliaires. Il faut parfois ajouter 2 gouttes d'eau oxygénée pour oxyder le pigment, s'il y en a une assez forte quantité. On peut aussi centrifuger au lieu de filtrer.

Cette réaction de Grimbert a été faite pour la recherche de la bilirubine dans l'urine. Je l'ai essayée sur le sérum et je l'ai abandonnée car elle est assez longue et les résultats ne sont pas très satisfaisants, en raison, sans doute, de la trop faible quantité de bilirubine contenue dans le sérum.

Réaction de Salkowski. — On ajoute du carbonate de soude au sérum, puis goutte à goutte, une solution de chlorure de calcium au 1/10°, on filtre, on lave le précipité et on le dissout dans l'acide chlorhydrique, on chauffe; la liqueur devient bleue si elle contient de la bilirubine.

Méthode de von Jaksch. — On filtre le sérum sur de l'amiant, puis on le coagule à 78-80°, dans une éprouvette étroite. Le sérum ne contenant pas de bilirubine est lactescent et coloré en jaune clair; s'il en contient, il prend une teinte verdâtre. Si l'on chauffe à nouveau à 50-60°, le sérum prend, suivant la quantité de bilirubine qu'il contient, une coloration verte plus ou moins intense.

Méthode de Hedenius. — On prend 3 à 4 c.c. de sérum et on ajoute 15 à 20 c.c. d'alcool, on filtre et on ajoute au liquide filtré, goutte à goutte, de l'acide chlorhydrique à 10 p. 100. On porte à deux reprises à l'ébullition. La présence de la bilirubine se manifeste par une teinte bleu verdâtre qui apparaît après un temps variable.

D'après Hammarsten, la limite de sensibilité de cette réaction serait de 1 pour 50.000.

Méthode de A. Jolles. — Il a basé une méthode de recherche et de dosage de la bilirubine sur l'action des halogènes (Cl, Br, I) en solution chloroformique ou alcoolique. La bilirubine dissoute dans le chloroforme donne de belles colorations vertes ou vert bleuâtre. Mais cette réaction est extrêmement délicate et on peut obtenir des décolorations complètes.

Réaction de Piettre. — Il signale une réaction très sensible, c'est la coloration violette que prend la bilirubine dissoute dans le chlorure de benzyl, sous l'influence des halogènes, du brome en particulier. Cette méthode permet de déceler des traces infinitésimales de pigment. La matière à analyser est traitée à chaud par le chlorure de benzyl, après filtration et refroidissement, on ajoute goutte à goutte une solution très faible de brome dans du chloroforme ou de l'alcool. S'il y a de la bilirubine, le chlorure de benzyl se colore fortement en violet-bleu.

Si je signale cette réaction si sensible, c'est pour faire remarquer qu'elle est applicable à la bilirubine pure seulement et qu'elle ne peut être un procédé de recherche de ce corps dans les liquides organiques.

Méthode de G. Lepehne. — Il préconise la méthode suivante : on place dans 3 tubes de 0,4 à 0,6 cm. de diamètre 0,25 c.c. de sérum frais. Dans un des tubes, tube de comparaison, on dilue le sérum avec 0,2 c.c. d'eau. Dans un autre tube, on

ajoute quelques petits grains de caféine associée à du salicylate de soude, pour activer la réaction.

On ajoute alors 0,2 c.c. du diazoréactif suivant:

Solution A

Acide sulfanilique	0,1
Acide chlorhydrique.	1,5
Eau distillée	100

Solution B

Nitrite de soude.....	0,5
Eau distillée	100

On mêle, pour l'usage, 5 c.c. de la solution A avec 0,15 c.c. de la solution B. On observe la réaction colorée sur fond blanc à la lumière réfléchie (1).

Méthode de Auché. — Il reproche à la méthode de Hayem, même modifiée, d'être peu sensible et de forcer à constater des nuances limites toujours difficiles à saisir; il en propose une autre basée sur le principe suivant : laisser de côté les réactions de coloration et de fluorescence et chercher dans le spectre, la bande, dans le rouge, en solution alcaline.

Il recommande le procédé suivant: on place dans un petit tube 2 à 3 c.c. de sérum donnant une épaisseur de 8-10 centimètres, on ajoute 2 gouttes de cyanure de zinc ammoniacal (10 gr. de cyanure de zinc dissous dans 100 c.c. d'ammoniaque); puis, goutte à goutte, une solution iodée au 1/100^e en surveillant l'apparition de la bande. Quand elle apparaît, on ajoute encore 2 à 3 gouttes de la solution iodée et quelques gouttes d'ammoniaque.

Il est rare, d'après cet auteur, qu'on n'ait pas de résultat sous 10 centimètres d'épaisseur. Avec le sérum de cheval, il suffit souvent de 1/2 ou 1 cm. car il est toujours très chargé de pigments.

(1) Je rappelle que la diazo-réaction d'Erlich est basée sur ce fait que l'acide sulfanilique, en se combinant avec les amines aromatiques, en présence d'acide azoteux, donne des produits de condensation colorés appelés diazoïques. Certaines urines donnent une coloration intense par ce réactif.

Méthode colorimétrique. — Plus il y a de bilirubine dans le sérum, plus sa teinte jaune est intense; il est donc possible d'appliquer à son dosage une méthode basée sur la coloration, sauf dans les cas où il y a trop d'hémoglobine ou lorsque le sérum est lactescent. La méthode la plus pratique est celle de Gilbert, Herscher et Posternak. Elle est basée sur ce principe que, dans un sérum artificiel, l'anneau bleu correspond toujours à une concentration définie de la bilirubine. En diluant le sérum initial et le sérum artificiel, on peut calculer la quantité de bilirubine contenue dans le sérum, connaissant la teneur en bilirubine qui fait apparaître l'anneau bleu. Ces auteurs ont fait construire un appareil propre à faire ce dosage, auquel ils ont donné le nom de « cholémimètre ».

La méthode de Stadelmann, qui consiste à peser les pigments isolés, n'est pas applicable au sérum; celle de A. Jolles, qui consiste à transformer la bilirubine par l'iode, ne convient pas non plus à cette recherche.

D'après Hijmans van den Berg, il n'existerait pas qu'une seule réaction colorée; il distingue une réaction prompte qui s'effectue en quelques secondes avec le diazo-réactif et une réaction ralentie qui se produit au bout de 30 secondes au plus. Selon lui, cela est dû à une différence dans la composition chimique de la bilirubine ou dans sa liaison avec d'autres corps. La réaction prompte caractériserait la bilirubine hépatique (bilirubine de stase) et la réaction lente, la bilirubine originaire du système cellulaire réticulo-endothélial (rate et ganglions); c'est la bilirubine de Lepehne, témoin d'une hémolyse excessive. Entre les deux, il existe une réaction diaphasée, ou après un léger changement de couleur, la réaction s'arrête pour se poursuivre et ne s'achever qu'après quelque temps; elle serait due à l'existence de deux espèces de bilirubine.

On voit que le problème ainsi posé devient extrêmement complexe et il faut attendre de nouvelles études précises pour vérifier cette hypothèse.

La méthode employée par cet auteur repose sur le fait qu'en désalbuminant du sérum avec de l'alcool, les pigments passent dans ce dernier. On prend du sérum, et on lui ajoute de l'al-

cool; les albumines coagulent. On centrifuge et on puise le liquide clair. On le met dans le bac du colorimètre, et on y ajoute le mélange diazo (acide sulfanilique chlorhydrique plus nitrite de soude). On y met aussi un peu d'alcool pour dissoudre les corps gras. On compare alors la teinte obtenue à celle d'une solution de sulfocyanure de fer dans l'éther dont l'intensité correspond à une solution donnée de bilirubine; et on calcule la valeur en bilirubine du sérum employé.

En résumé, de toutes ces méthodes de recherche de la bilirubine, une seule paraît vraiment pratique lorsqu'il s'agit du sérum; c'est la caractérisation de l'anneau bleu par l'acide nitrique nitreux. Nous avons vu que cette réaction appartient en propre à la bilirubine et non à d'autres corps.

Suivant la concentration en bilirubine du liquide examiné, la sensibilité de la réaction varie dans d'assez grandes limites : la série des anneaux colorés apparaît seulement lorsque la concentration atteint ou dépasse 1 pour 3.500.

Si la concentration est inférieure à 1 pour 7.000 l'anneau bleu seul se détache nettement sur le coagulum albumineux; si la concentration est inférieure à 1 pour 40.000, on n'obtient plus aucune réaction.

UROBILINE

On sait que, si l'on fait agir sur la bilirubine un agent réducteur, il se forme de l'urobiline, ou un corps plus réduit, le chromogène de l'urobiline, qui peut redonner de l'urobiline par oxydation.

L'urobiline ne se trouve dans le sérum qu'en très faible proportion; il est rare qu'on l'y rencontre en grande quantité.

Elle peut être caractérisée par le spectroscope (bande entre le bleu et le vert, en milieu acide), ou bien par la fluorescence qu'elle acquiert lorsqu'elle est traitée par un sel de zinc.

A. Morel et O. Monod ont donné une technique de recherche très sensible. Pour eux, le caractère le plus typique de l'urobiline est la fluorescence verte qu'elle donne en présence des sels de zinc, mais leur technique se caractérise par un épuisement plus parfait du liquide, et son éclairage intensif.

On ajoute à 2 cc. de sérum, 10 fois le poids d'alcool éthylique à 95° et on chauffe pendant 1/2 heure à l'ébullition, au bain-marie, au réfrigérant ascendant. La solution alcoolique, séparée du coagulum par essorage, est concentrée au bain-marie à 3 cc. On additionne d'une goutte du réactif d'Obermayer (1) dilué à 1 o/o, puis on ajoute 2 cc. du réactif suivant :

Acétate de zinc.....	1 gramme
Alcool à 95°.....	100 grammes
Acide acétique.....	jusqu'à clarification

On abandonne le mélange 24 heures, on filtre ou on centrifuge, et on verse dans un tube à essai. On place alors ce tube au foyer d'un système optique convergent puissamment éclairé (lampe à arc, à magnésium ou même manchon incandescent). On décèle ainsi des traces d'urobiline indécélables par d'autres méthodes.

Grigaut a préconisé la méthode suivante : on ajoute à 10 cc. de sérum, 10 cc. du réactif suivant :

Perchlorure de fer.....	5 gouttes
Acide acétique au 1/10°.....	20 cc.
Eau distillée.....	80 cc.

Le mélange, préalablement saturé de sulfate de soude, est porté à l'ébullition, dans une capsule, en l'agitant. On filtre, et l'urobiline passe dans le filtrat, alors que les pigments restent sur le filtre. On ajoute au filtrat 4 cc. de chloroforme thymolé à 15 o/o (Auché) ; le chloroforme se sépare et on le reçoit dans un tube ; on ajoute la solution d'acétate de zinc dont nous avons donné la formule, jusqu'à cessation du précipité ; on obtient alors la fluorescence caractéristique.

La présence de pigments biliaires gênant la recherche de l'urobiline, Grimbart et Poirot viennent de donner tout récemment

(1) Réactif d'Obermayer :

Perchlorure de fer : 4 cc.

Acide chlorhydrique pur : 1.000.

une nouvelle technique pour la recherche de ce corps, qui consiste à transformer la bilirubine en biliverdine insoluble dans le chloroforme; puis, après épuisement par le chloroforme, à ajouter à ce dernier une solution chloroformique d'acétate de zinc. Cette méthode a été préconisée pour la recherche de l'urobiline dans le liquide duodénal, mais elle peut s'appliquer au sérum, à condition de le diluer pour ne pas être trop gêné par le magma dû aux précipitations.

CHAPITRE II

RECHERCHES PERSONNELLES

La cause de la coloration du sérum de cheval paraissant nettement établie, à savoir qu'elle est due à la présence de petites quantités de bilirubine, les différentes influences physiques ou chimiques qui font varier la teneur en bilirubine d'un sérum, par suite de ses transformations successives, nous expliquent à *priori* les différences de coloration des sérums.

A notre connaissance, aucune expérience n'a été tentée pour étudier ces actions, et aucune démonstration n'a été donnée pouvant expliquer des faits que nous observons chaque jour. Une argumentation par voie de raisonnement, pour si logique qu'elle soit, n'a jamais la valeur d'une preuve expérimentale : c'est pourquoi nous avons repris la question dans son ensemble, et nous allons étudier l'influence d'un certain nombre d'agents sur le sérum normal de cheval.

I. — Relations entre la coloration du sérum et la présence de la bilirubine

Il est démontré par les différents auteurs que la bilirubine est la cause de la coloration du sérum. Donc, à *priori*, l'intensité de la coloration est fonction de la quantité de bilirubine contenue dans un sérum donné, et sa décoloration doit être causée par la disparition de ce pigment, sous une ou des influences à déterminer.

Nous avons essayé la démonstration directe de cette hypo-

thèse, en opérant sur un grand nombre de sérums. Pour la recherche de la bilirubine, nous nous sommes arrêtés à la méthode de Hayem. Voici comment nous opérons : dans un petit tube d'environ 8 mm. de diamètre, on verse 2 cc. du sérum examiné, et à l'aide d'une pipette effilée, on porte au fond du tube 1 cc. du réactif nitreux nitrique dont nous avons donné la formule. On laisse couler le réactif dans le fond du tube; il se forme, au contact, un coagulum jaune xantho-protéique, et au-dessus un coagulum blanc. A la limite des deux apparaît un anneau bleu caractéristique de la présence de la bilirubine. On peut, si l'on veut, opérer en sens inverse, en versant d'abord au fond du tube le réactif nitrique, et en laissant arriver à la surface le sérum; le résultat est le même. Nous verrons cependant, que le choix du moyen n'est pas toujours indifférent, lorsque nous étudierons la densité des sérums provenant d'un même cheval, à différentes époques. Lorsqu'il y a de la bilirubine en quantité normale, la réaction se manifeste instantanément par une coloration bleue diffuse; elle se précise ensuite sous la forme d'un anneau, mais il faut attendre environ un quart d'heure pour le voir nettement; parfois, il se fait attendre jusqu'à 2 et 3 heures. Après sa formation, l'anneau bleu disparaît progressivement en même temps que le coagulum jaune envahit toute la hauteur du liquide primitif.

Nous allons donner le relevé de notre cahier d'expériences, en indiquant la coloration du sérum examiné, et le résultat de la recherche de la bilirubine. L'indication + indique un anneau bleu, O indique l'absence d'anneau (1).

(1) Il est bien entendu que cette indication de la présence ou de l'absence de la bilirubine ne peut être comprise comme une valeur absolue. Des méthodes plus sensibles que celle que j'ai employée déceleraient peut-être des traces de ce corps, non décelables par la méthode de Hayem.

Mais puisque la méthode que j'ai choisie a été mise en œuvre dans toutes mes expériences, les résultats obtenus sont tous comparables, dans l'ordre de grandeur et de précision qu'on peut attendre du procédé employé. Cette précision reconnaît comme limite 1 pour 40.000; au delà, on n'obtient plus de réaction.

DATE DE L'EXPÉRIENCE	N ^{os}	COLORATION DU SÉRUM	RÉACTION DE HAYEM
26 Septembre	11	décoloré	0
—	12	décoloré	0
—	13	décoloré	0
—	14	décoloré	0
—	15	décoloré	0
—	16	décoloré	0
—	17	décoloré	0
—	18	décoloré	0
—	19	décoloré	0
—	20	décoloré	0
—	21	décoloré	0
—	22	décoloré	0
—	23	décoloré	0
—	24	décoloré	0
—	25	décoloré	0
—	26	décoloré	0
—	27	décoloré	0
—	28	décoloré	0
—	29	décoloré	0
—	30	décoloré	0
1 ^{er} Octobre	32	jaune pâle	0
5 —	37	pas très coloré	0
—	38	pas coloré	0
—	39	jaune très clair	0
—	40	jaune très clair	0
—	41	jaune paille	0
—	42	jaune clair	0
—	43	jaune clair	0
6 —	44	jaune clair	0
—	45	jaune pâle	0
—	46	jaune pâle	0
—	47	jaune clair	0
8 —	51	jaune clair	0
—	53	jaune pâle	0
10 —	56	jaune pâle	0
—	57	jaune pâle	0
—	59	jaune pâle	0
—	61	rougeâtre clair	0
—	64	décoloré	0
—	65	jaune pâle	0
—	66	décoloré	0
23 —	78	jaune pâle	0

DATE DE L'EXPÉRIENCE	N ^{os}	COLORATION DU SÉRUM	RÉACTION DE HAYEM
—	—	—	—
—	79	jaune pâle	0
—	80	jaune pâle	0
—	81	jaune pâle	0
—	82	jaune pâle	0
—	83	jaune pâle	0
—	84	jaune pâle	0
—	85	jaune pâle	0
—	86	jaune pâle	0
—	87	jaune pâle	0
—	88	jaune pâle	0
—	89	jaune pâle	0
—	90	jaune pâle	0
—	91	jaune pâle	0
—	92	jaune pâle	0
—	93	jaune pâle	0
—	94	jaune pâle	0
25 —	96	jaune assez pâle	0
31 —	115	décoloré	0
—	116	décoloré	0
—	117	décoloré	0
—	118	décoloré	0
—	119	décoloré	0
—	120	décoloré	0
—	121	décoloré	0
—	122	décoloré	0
—	123	décoloré	0
28 Novembre	159	décoloré	0
—	160	décoloré	0
—	161	jaune pâle	0
—	162	jaune pâle	0
—	163	décoloré	0
—	164	jaune pâle	0
—	165	jaune pâle	0
—	166	jaune pâle	0
25 Septembre	7	jaune or	+
26 —	9	jaune or	+
—	10	jaune or	+
1 ^{er} Octobre	31	beau jaune	+
2 —	33	beau jaune or	+
—	34	beau jaune	+
—	35	beau jaune	+
5 —	36	beau jaune	+
6 —	48	jaune or pâle	+

DATE DE L'EXPÉRIENCE	N ^{os}	COLORATION DU SÉRUM	RÉACTION DE HAYEM
8 —	49	jaune assez fort	+
—	50	beau jaune	+
—	52	jaune or	+
—	54	jaune or clair	+
10 —	58	jaune or	+
—	60	jaune rougeâtre	+
—	62	jaune or	+
—	63	jaune paille foncé	+
—	67	jaune or magnifique	+
—	68	jaune or	+
18 —	69	beau jaune	+
—	71	jaune or	+
—	72	jaune or	+
—	73	jaune or	+
—	74	jaune or	+
—	75	jaune or	+
—	76	jaune or	+
—	77	jaune or	+
25 —	95	jaune or	+
—	97	jaune or	+
—	99	jaune or	+
—	100	jaune or	+
—	101	jaune or	+
—	102	jaune or	+
—	103	jaune or	+
31 —	124	jaune franc	+
—	125	jaune franc	+
—	126	jaune chrome	+
—	127	jaune or	+
—	128	jaune or	+
—	129	jaune or	+
—	130	jaune or pâle	+
—	131	jaune or	+
—	132	jaune or pâle	+
9 Novembre	133	jaune or pâle	+
—	134	jaune or pâle	+
—	135	jaune or	+
—	136	jaune or pâle	+
—	137	jaune or	+
—	138	jaune or	+
—	139	jaune or	+
—	140	jaune or pâle	+
—	141	beau jaune	+

DATE DE L'EXPÉRIENCE	Nos	COLORATION DU SÉRUM	RÉACTION DE HAYEM
14 —	142	beau jaune	+
—	143	jaune un peu pâle	+
—	144	beau jaune	+
—	145	jaune un peu pâle	+
—	146	beau jaune	+
—	147	jaune un peu pâle	+
—	148	jaune or	+
—	149	presque décoloré	+ traces
—	150	jaune or	+
21 —	151	jaune pâle	+ traces
—	152	jaune pâle	+ traces
—	153	jaune	+
—	154	jaune	+
—	155	jaune or	+
—	156	jaune or	+
—	157	jaune or	+
—	158	jaune pâle	+ traces

La lecture de ce tableau fait ressortir des indications très nettes; toutes les fois qu'un sérum est d'une belle teinte jaune or ou chrome, la réaction de Hayem, presque immédiate, indique la présence de bilirubine. Au fur et à mesure que, sous une influence quelconque, le sérum perd sa belle coloration, et devient plus pâle, la réaction peut encore persister, mais elle est plus tardive et moins intense; on a toute une gamme de jaunes donnant soit une réaction faible, soit même simplement des traces de bleu.

Lorsque la décoloration est assez accentuée, le sérum ne donne plus la réaction de Hayem.

On peut donc conclure que les sérums franchement jaunes donnent toujours la réaction de la bilirubine; que, au contraire, les sérums jaunes très pâles ou décolorés ne donnent plus cette réaction et que, entre ces colorations extrêmes, l'intensité de la coloration du sérum de cheval est fonction de la quantité de bilirubine qui y est contenue.

II. — Influence du nombre de saignées sur la coloration du sérum et sur sa teneur en bilirubine

Nous avons suivi un certain nombre de chevaux, depuis leur première saignée, et observé toutes les semaines les changements progressifs de la coloration des sérums obtenus; et nous avons,

en même temps, contrôlé par la réaction de Hayem, la présence ou l'absence de la bilirubine.

Nous allons donner un certain nombre d'exemples, en inscrivant, en regard des saignées, la coloration observée, cette indication étant relevée sur le cahier d'expérience où ces notes étaient prises au fur et à mesure des examens.

1° Matricule 1447

SAIGNÉE	DATE	COLORATION	RÉACTION DE	
			HAYEM	
1 ^{re}	5 Octobre 23	jaune or magnifique	+	immédiat
2 ^e	13 —	jaune or un peu vert	+	
3 ^e	22 —	jaune or	+	
4 ^e	29 —	jaune franc	+	
5 ^e	6 Novembre	jaune or pâle	+	
6 ^e	13 —	jaune	+	
7 ^e	20 —	jaune pâle	+	traces
8 ^e	26 —	décoloré	0	

Cet exemple est très caractéristique; on observe la décoloration du sérum et lorsqu'il devient jaune pâle, on ne trouve plus que des traces de bilirubine. Dès que la décoloration est manifeste, la réaction ne se produit plus.

2° Matricule 1451

SAIGNÉE	DATE	COLORATION	RÉACTION DE	
			HAYEM	
1 ^{re}	5 Octobre 23	jaune or	+	
2 ^e	13 —	beau jaune	+	
3 ^e	22 —	jaune assez pâle	+	
4 ^e	29 —	jaune chrome	+	
5 ^e	6 Novembre	jaune assez pâle	+	
6 ^e	13 —	jaune assez pâle	+	
7 ^e	20 —	jaune pâle	+	traces
8 ^e	26 —	décoloré	0	

3° Matricule 1452

SAIGNÉE	DATE	COLORATION	RÉACTION DE HAYEM
—	—	—	—
1 ^{re}	6 Octobre 23	jaune or	+
2 ^e	22 —	jaune or	+
3 ^e	29 —	jaune or	+
4 ^e	6 Novembre	jaune or	+
5 ^e	13 —	beau jaune	+
6 ^e	20 —	jaune	+
7 ^e	26 —	jaune pâle	0

4° Matricule 1453

SAIGNÉE	DATE	COLORATION	RÉACTION DE HAYEM
—	—	—	—
1 ^{re}	8 Octobre 23	jaune or	+ immédiat
2 ^e	22 —	jaune vert	+
3 ^e	29 —	jaune or	+
4 ^e	6 Novembre	jaune or pâle	+
5 ^e	13 —	un peu pâle	+
6 ^e	20 —	jaune	+
7 ^e	26 —	jaune pâle	0

5° Matricule 1455

SAIGNÉE	DATE	COLORATION	RÉACTION DE HAYEM
—	—	—	—
1 ^{re}	13 Octobre 23	jaune or	+
2 ^e	22 —	jaune or	+
3 ^e	29 —	jaune or	+
4 ^e	6 Novembre	jaune or	+
5 ^e	13 —	beau jaune	+
6 ^e	20 —	jaune or	+
7 ^e	26 —	décoloré	0

6° Matricule 1456

SAIGNÉE	DATE	COLORATION	RÉACTION DE HAYEM
—	—	—	—
1 ^{re}	13 Octobre 23	jaune or	+
2 ^e	22 —	jaune or	+
3 ^e	29 —	jaune or pâle	+
4 ^e	6 Novembre	jaune or	+
5 ^e	13 —	un peu pâle	+
6 ^e	20 —	jaune	+
7 ^e	26 —	jaune pâle	0

7° Matricule 1459

SAIGNÉE	DATE	COLORATION	RÉACTION DE HAYEM
—	—	—	—
1 ^{re}	9 Octobre 23	jaune or	+
2 ^e	22 —	jaune or	+
3 ^e	29 —	jaune or	+
4 ^e	6 Novembre	jaune or	+
5 ^e	13 —	jaune or	+
6 ^e	20 —	jaune or	+
7 ^e	26 —	jaune pâle	0

8° Matricule 1460

SAIGNÉE	DATE	COLORATION	RÉACTION DE HAYEM
—	—	—	—
1 ^{re}	9 Octobre 23	jaune or	+
2 ^e	22 —	jaune or	+
3 ^e	29 —	jaune or pâle	+
4 ^e	6 Novembre	jaune or pâle	+
5 ^e	13 —	presque décoloré	+ traces
6 ^e	20 —	jaune pâle	+ traces
7 ^e	26 —	jaune pâle	0

Le phénomène est donc très net et ces huit exemples paraissent calqués les uns sur les autres. Au fur et à mesure que le sérum pâlit, jusqu'à sa décoloration, on n'aperçoit plus que des traces de bilirubine et finalement, on constate sa disparition. La dégradation de la teinte se fait insensiblement, mais, parfois, comme dans les exemples 5 et 7, la teinte tombe brusquement en quelques jours, du jaune d'or au jaune très pâle. Ce point étant acquis, on voit aussi que la disparition de la bilirubine paraît se faire aux environs de la 7^e ou 8^e saignée, dans les exemples ci-dessus. Ces animaux arrivés ensemble, à la même période de l'année, soumis au même régime, par conséquent dans des conditions expérimentales aussi semblables que possible, dans la pratique, on peut penser que le temps nécessaire à la disparition de la bilirubine doit se faire aux alentours des mêmes dates.

En serait-il de même pour des animaux examinés pendant un temps assez long, pour que des différences plus sensibles puissent intervenir dans le phénomène ?

Pour y répondre, nous avons examiné un très grand nombre de sérums prélevés sur des animaux depuis la saignée initiale N° 1, jusqu'à une saignée portant le N° 116. Nous aurons ainsi les limites inférieure et supérieure entre lesquelles se fait la disparition du pigment coloré.

Le tableau suivant donne le résultat de cette recherche.

NUMÉRO DE L'EXPÉRIENCE	NOMBRE DE SAIGNÉES	COLORATION	RÉACTION
67	1	jaune or	+
68	1	jaune or	+
71	1	jaune or	+
72	1	jaune or	+ immédiat
73	1	jaune or	+ immédiat
74	1	jaune or	+
75	1	jaune or	+ immédiat
76	1	jaune or	+
77	1	jaune or	+
141	1	beau jaune	+
50	2	beau jaune	+
69	2	beau jaune	+
70	2	jaune or vert	+
97	2	jaune or	+
98	2	jaune vert	+
99	2	jaune or	+
100	2	jaune or	+
101	2	jaune or	+
102	2	jaune or	+
103	2	jaune or	+
150	2	jaune or	+ immédiat
95	3	jaune or	+
96	3	jaune assez pâle	+
127	3	jaune or	+
128	3	jaune or	+
129	3	jaune or	+
130	3	jaune or pâle	+
131	3	jaune or	+
132	3	jaune or pâle	+ très légère
135	4	jaune or	+ immédiat
136	4	jaune or pâle	+
137	4	jaune or	+ immédiat

NUMÉRO DE L'EXPÉRIENCE	NOMBRE DE SAIGNÉES	COLORATION	RÉACTION
138	4	jaune or	+ immédiat
139	4	jaune or	+ immédiat
140	4	jaune or pâle	+
133	5	jaune or pâle	+
134	5	jaune or pâle	+
144	5	beau jaune	+
146	5	beau jaune	+
147	5	jaune un peu pâle	+
148	5	jaune or	+ immédiat
149	5	presque décoloré	+ traces
142	6	beau jaune	+
143	6	jaune un peu pâle	+
153	6	jaune	+
154	6	jaune	+
155	6	jaune or	+
156	6	jaune	+
157	6	jaune or	+
158	6	jaune pâle	+ traces
151	7	jaune pâle	+ traces
152	7	jaune pâle	+ traces
161	7	jaune pâle	o
162	7	jaune pâle	o
163	7	décoloré	o
164	7	jaune pâle	o
165	7	jaune pâle	o
166	7	jaune pâle	o
52	8	jaune or	+
159	8	décoloré	o
160	8	décoloré	o
191	8	décoloré	o
192	8	décoloré	o
193	8	décoloré	o
44	9	jaune clair	o
49	9	jaune assez fort	+
188	9	jaune or	+
189	9	décoloré	o
190	9	jaune	+
185	10	décoloré	o
186	10	décoloré	o
187	10	jaune	+

NUMÉRO DE L'EXPÉRIENCE	NOMBRE DE SAIGNÉES	COLORATION	RÉACTION
182	11	décoloré	0
183	11	décoloré	0
184	11	décoloré	0
179	12	décoloré	0
180	12	décoloré	0
181	12	décoloré	0
94	13	jaune pâle	0
176	13	décoloré	0
177	13	décoloré	0
178	13	décoloré	0
93	14	jaune pâle	0
106	14	vert	+ très légère
175	14	décoloré	0
41	15	jaune paille	0
173	15	décoloré	0
174	15	décoloré	0
171	17	décoloré	0
172	17	décoloré	0
38	18	pas coloré	0
105	18	vert	+ très légère
168	18	décoloré	0
169	18	décoloré	0
170	18	décoloré	0
66	21	décoloré	0
40	23	jaune très clair	0
91	23	jaune pâle	0
92	23	jaune pâle	0
90	25	jaune pâle	0
56	26	jaune pâle	0
61	26	rougeâtre clair	0
65	27	jaune pâle	0
59	28	jaune pâle	0
42	29	jaune clair	0
64	29	décoloré	0

NUMÉRO DE L'EXPÉRIENCE	NOMBRE DE SAIGNÉES	COLORATION	RÉACTION
43	31	jaune clair	0
45	31	jaune paille	0
39	47	jaune très clair	0
55	50	vert	0
53	51	jaune pâle	0
104	60	vert	0
51	61	jaune paille clair	0
122	64	décoloré	0
123	64	décoloré	0
121	68	décoloré	0
120	70	décoloré	0
118	78	décoloré	0
119	78	décoloré	0
115	80	décoloré	0
116	80	décoloré	0
117	80	décoloré	0
89	90	pâle	0
88	100	pâle	0
87	101	pâle	0
86	103	pâle	0
85	105	pâle	0
84	107	pâle	0
83	110	pâle	0
82	111	pâle	0
81	112	pâle	0
79	115	pâle	0
80	115	pâle un peu rouge	0
78	116	pâle	0

Cette étude portant sur 135 sérums différents met bien en évidence les faits suivants :

1° Tous les sérums ayant une belle couleur jaune donnent à coup sûr la réaction de la bilirubine.

2° Cette réaction va en s'atténuant au fur et à mesure que l'intensité de la coloration diminue.

3° Les saignées successives ont pour effet de diminuer la coloration du sérum.

4° La disparition de la bilirubine se fait déjà dans certains cas après la 7^e saignée ; elle persiste rarement jusqu'à la 18^e.

Il ne paraît pas douteux que des modifications profondes du foie, des reins, et peut-être des glandes endocrines, surviennent à la suite de ces saignées répétées.

Herbert D. Pease et Richard M. Pearce ont étudié les lésions produites chez les chevaux immunisés avec des toxines tétanique ou diphtérique ou avec des streptocoques, et ils ont trouvé des lésions de nécrose, d'hémorragie et de rupture du foie, avec thrombose de la veine porte.

A. Pettit et G. Loiseau, sans trouver de lésions aussi accusées ont pourtant vu des dégénérescences du foie, et des lésions rénales.

J'ai moi-même observé des ruptures du foie.

La question est en ce moment à l'étude, mais je ne puis faire état d'un travail qui n'est pas terminé.

III. — Influence de l'âge du sérum sur sa coloration

Nous entendons par âge du sérum, le temps qui s'est écoulé entre le moment où il a été récolté, et le moment de son examen.

Pour pouvoir utilement juger de cette influence de l'âge, en éliminant autant que possible les autres causes qui peuvent influencer le sérum, nous prendrons des ampoules mises en boîtes, par conséquent à l'abri de la lumière.

Si nous examinons différents lots de sérums ainsi mis en ampoules, nous constatons que le vieillissement a une influence très nette sur la teinte du sérum ; il se décolore peu à peu, et au bout de quelques mois, il est souvent complètement décoloré.

On peut observer toutes les gammes dans ce phénomène, et la décoloration se fera plus ou moins vite suivant que le sérum était, à sa récolte plus ou moins coloré, c'est-à-dire, contenait une quantité plus ou moins grande de bilirubine.

Voici le résultat de l'examen d'un certain nombre de ces sérums :

N ^{os}	EXAMEN L ^e	SÉRUM DE	AGE	COLORATION	RÉACTION
167	3 déc. 23	Juin 1923	6 mois	décoloré	0
195	5 —	Mai 1923	7 mois	jaune or	+
196	5 —	— —	—	jaune or	+
197	5 —	— —	—	jaune or pâle	+
198	5 —	— —	—	jaune or pâle	+
199	5 —	— —	—	jaune pâle	0
200	5 —	— —	—	jaune pâle	0
201	5 —	— —	—	jaune pâle	0
202	5 —	— —	—	décoloré	0
203	5 —	— —	—	décoloré	0
204	5 —	— —	—	décoloré	0
205	5 —	— —	—	décoloré	0
206	5 —	— —	—	décoloré	0
207	5 —	— —	—	décoloré	0
208	9 janv. 24	Sept. 1922	15 mois	décoloré	0
209	9 —	— —	—	décoloré	0
210	9 —	— —	—	décoloré	0
211	9 —	— —	—	décoloré	0
212	9 —	— —	—	décoloré	0
213	9 —	— —	—	décoloré	0
11	26 oct. 23	1916	8 ans	décoloré	0
12	26 —	—	—	décoloré	0
13	26 —	—	—	décoloré	0
14	26 —	—	—	décoloré	0
15	26 —	—	—	décoloré	0
16	26 —	—	—	décoloré	0
17	26 —	—	—	décoloré	0
18	26 —	—	—	décoloré	0
19	26 —	—	—	décoloré	0
20	26 —	—	—	décoloré	0
21	26 —	—	—	décoloré	0
22	26 —	—	—	décoloré	0
23	26 —	—	—	décoloré	0
24	26 —	—	—	décoloré	0

N ^{os}	EXAMEN LE	SÉRUM DE	ÂGE	COLORATION	RÉACTION
—	—	—	—	—	—
25	26 octobre 1923	1916	8 ans	décoloré	0
26	26 —	—	—	décoloré	0
27	26 —	—	—	décoloré	0
28	26 —	—	—	décoloré	0
29	26 —	—	—	décoloré	0
30	26 —	—	—	décoloré	0

Ces 44 exemples dont 20 âgés de 8 années, montrent bien que la bilirubine se conserve parfois longtemps, sans changements appréciables (pendant 7 mois, pour 4 de ces sérums) et que, par-tant, le sérum peut garder une belle teinte jaune pendant plu-sieurs mois. Nous sommes tombés par hasard, sur des séries de 7 mois, dans lesquelles, certains sérums sont encore très colorés et donnent la réaction de la bilirubine, alors que certains autres ont pâli, et ne la donnent plus. Cela aurait pu se produire avec des sérums beaucoup moins vieux. Il est impossible d'assigner un temps certain où se fait la décoloration, puisque, comme nous l'avons dit, l'état initial du sérum conditionne son état ultérieur, au point de vue coloration.

La seule conclusion qu'il soit permis de tirer à coup sûr, est que la décoloration est fonction de l'âge du sérum, dans les con-ditions que nous avons envisagées, c'est-à-dire en se soustrayant autant que possible aux influences physiques extérieures.

IV. — Sous quelle influence se produit la décoloration du sérum?

Prenons différents sérums d'animaux saignés pour la pre-mière fois, donc, des sérums très colorés et donnant tous une réaction intense de Hayem; et, examinons dans une série d'expé-riences les influences qui peuvent faire varier leur coloration, en nous limitant pour le moment à l'action de l'air et de la lumière.

1^{re} Expérience

10 ampoules de chacune 10 cc. sont placées le 20 novembre devant une fenêtre bien éclairée. A ce moment, le sérum donne la réaction de la bilirubine.

Chaque jour, on prend une ampoule pour examen. Après 30 heures d'exposition à la lumière, on n'obtient plus la réaction, et le sérum est déjà décoloré. Ce temps, très court, est d'autant plus remarquable que, à cette époque de l'année, la luminosité est faible et la lumière peu intense.

2° Expérience

Faite dans les mêmes conditions, le 10 décembre, par un temps de brouillard tel, qu'il n'y a pour ainsi dire pas de jour. Cependant, au bout de 23 heures, on n'obtient plus qu'une faible réaction qui a disparu à l'examen de la 39^e heure. Le sérum a changé de teinte.

Dans ces deux expériences, faites à dessein avec de très mauvaises conditions de luminosité, on voit qu'il y a un changement très rapide de la quantité de bilirubine contenue dans le sérum. Nous remarquerons que les deux seuls facteurs que nous puissions faire intervenir dans la discussion, sont la lumière et le peu d'air contenu dans l'ampoule.

3° Expérience

25 tubes à essai contenant chacun 10 cc. de sérum frais, sont mis sous la trompe à vide; lorsque le vide est fait à l'intérieur de ces tubes, on les ferme à la lampe. Dans ces conditions, nous éliminons l'influence de l'air.

Le 2 novembre, tous ces tubes sont mis en pleine lumière; un tube examiné au début de l'expérience donne la réaction de la bilirubine.

Un examen fait le 6 novembre montre que la réaction est faible; et le 9, elle a disparu, sans jamais réapparaître les jours suivants. On voit donc qu'au bout de 40 heures d'exposition à la lumière du jour, la réaction était déjà affaiblie, et qu'elle s'atténue de plus en plus, jusqu'à sa disparition.

La lumière est donc capable, à elle seule, de produire le changement de coloration, par disparition de la bilirubine, et cela en un temps très court.

4^e Expérience

Dans 12 tubes à essai, on met par tube 10 cc. de sérum frais ayant une belle couleur jaune, et donnant la réaction de la bilirubine.

4 de ces tubes sont bouchés au coton; l'air peut donc s'y renouveler.

4 de ces tubes sont fermés à la lampe; l'air est donc confiné.

4 de ces tubes sont fermés à la lampe sous le vide; donc sans air.

Dans chacun de ces groupes, on laisse 2 tubes à la lumière, et on en met 2 à l'obscurité (dans une boîte enfermée dans une armoire obscure).

L'expérience commencée le 2 octobre, donne les résultats suivants : la décoloration des tubes exposés à la lumière, déjà manifeste le 7 octobre, a été en s'accroissant jusqu'au 25. Pendant toute cette période, les tubes dans lesquels le vide avait été fait, ont paru avoir un retard appréciable dans la décoloration.

Le 25 octobre, on compare les tubes placés à l'obscurité et ceux laissés à la lumière. Les premiers ont encore une très belle teinte jaune, alors que les seconds sont tous décolorés. La recherche de la bilirubine, faite le même jour, a montré son existence dans tous les tubes placés à l'obscurité, et sa disparition dans tous les tubes laissés à la lumière.

Donc, la lumière intervient comme facteur primordial dans la décoloration du sérum. Le fait que les tubes dans lesquels le vide était fait ont éprouvé un retard dans la décoloration, semble indiquer que l'air a tout de même une influence sur la décoloration mais que cette influence est très limitée et ne saurait être comparée à celle de la lumière.

5^e Expérience

Pour préciser ce dernier point, on fait l'expérience suivante : le 6 octobre on met dans 3 ballons 200 cc. de sérum frais.

Le 1^{er} ballon est enveloppé de papier noir, et est placé à l'obscurité.

Le 2^e porte 2 tubulures, de façon à assurer à l'intérieur du sérum une circulation d'air. Cette circulation se fait à l'aide d'une

trompe à vide et à une cadence régulière de une bulle à la seconde.

Le 3^e est placé, sur la paille, à côté du précédent, et bouché seulement au coton.

Le 6 octobre, on commence l'expérience; le sérum est d'une belle teinte jaune dans les 3 flacons.

Le 19 octobre, les résultats sont les suivants : le 1^{er} ballon conservé à l'obscurité a gardé sa belle teinte jaune. Le 2^e, dans lequel de l'air a passé pendant 128 heures 45 minutes, est devenu d'une teinte vert pâle. Le 3^e, resté à côté du précédent à la lumière a aussi la même teinte vert pâle, mais cependant il y a une petite différence, il est moins pâle que le 2^e.

Donc, dans cette expérience, comme dans la précédente, le facteur capital de la décoloration est la lumière et la part revenant à l'action de l'air est très minime.

6^e Expérience

Cette notion acquise va être encore précisée par l'expérience suivante :

On prend, comme ci-dessus, 3 ballons contenant chacun 200 cc. de sérum, et on refait la même expérience mais en enveloppant de papier noir le ballon dans lequel on fait la circulation d'air. On pourra ainsi se rendre compte de la part exacte qui revient à l'air dans la décoloration.

Cette expérience a duré du 31 octobre au 12 novembre. Au début, le sérum donnait la réaction très nette de la bilirubine. L'examen du 12 novembre montre que :

le ballon mis à l'obscurité a conservé sa belle teinte jaune et donne une réaction intense et immédiate;

le sérum du ballon enveloppé de papier noir et dans lequel l'air a circulé pendant toute l'expérience, a peu changé de couleur et il donne une réaction à la bilirubine très nette, quoique un peu plus lente que dans le ballon précédent;

le sérum du 3^e ballon, laissé à la lumière, est complètement décoloré et ne donne plus aucune réaction.

On voit donc, dans cette expérience, comme précédemment, que l'influence de la lumière est capitale dans la décoloration du

sérum et que la part de l'air ne se manifeste que par un retard dans la réaction de la bilirubine.

7^e Expérience

Cette influence minime de l'air peut être, *a priori*, attribuée à une action de l'oxygène agissant comme oxydant de la bilirubine.

Nous avons essayé de mettre cette action en évidence par une expérience.

On met du sérum frais dans deux ballons; le premier est placé à l'obscurité; le second est enveloppé de papier noir, pour annuler l'influence de la lumière et est monté de telle façon qu'on puisse faire passer de l'oxygène au travers du sérum.

Le 3 décembre, on relie ce ballon à un obus d'oxygène et on laisse passer lentement le gaz au travers du sérum. Après épuisement de l'obus, c'est-à-dire après dégagement de 500 litres d'oxygène, on compare la coloration de ce ballon à celle du ballon mis à l'obscurité; il n'y a pas de changement appréciable dans la teinte.

L'action de l'oxygène est donc très faible, et il en faudrait faire passer des quantités considérables dans un sérum pour obtenir une très légère décoloration, comme nous l'avons fait précédemment, en faisant barboter de l'air pendant de longues journées au travers d'une couche de sérum.

8^e Expérience

Toutes les expériences précédentes qui concordent pour arriver à la même conclusion peuvent être contrôlées par une expérience inverse, expérience cruciale.

On prend des ampoules de sérum frais, renfermées de suite après leur fabrication, dans de l'ouate et placées dans une boîte fermant hermétiquement.

Le 17 novembre, nous examinons un certain nombre de ces ampoules, faites de la veille; elles sont d'une très belle teinte jaune et donnent une réaction immédiate de la bilirubine.

Des examens pratiqués toutes les semaines montrent que, après plus d'un mois, la teinte de ces ampoules n'a pas varié et que la réaction de la bilirubine est du même ordre. Pour éliminer l'influence de la composition du verre dans cette expérience deux

séries parallèles ont été faites, des ampoules en verre alcalin, et des ampoules en verre neutre (neutralité au méthyl orange). Il n'y a eu aucune différence entre les sérums des deux séries d'ampoules.

De tout ce groupe d'expériences qui se contrôlent réciproquement, on peut tirer une conclusion très ferme :

La lumière du jour est le facteur prépondérant de la décoloration des sérums; la part de l'oxygène de l'air est très réduite dans le phénomène.

Cette notion nous paraissant posée d'une manière indiscutable, nous allons chercher maintenant à pénétrer plus intimement dans le phénomène et rechercher quels sont les rayons du spectre qui agissent sur le sérum, pour le décolorer.

V. — Influence des radiations lumineuses sur la décoloration du sérum normal

Pour la recherche expérimentale de l'influence des radiations lumineuses, sur la coloration du sérum normal, un certain nombre de méthodes auraient pu être employées; je me suis arrêté à celle qui me paraissait la plus simple, et qui pouvait peut-être être susceptible d'applications pratiques. Le sérum d'une même saignée ayant été mis dans des ampoules de même verre, j'en ai pris un certain nombre qui furent entourées de feuilles de gélatine, colorées avec les différentes couleurs du spectre.

Ces feuilles de gélatines, très minces, ont été faites spécialement pour cette expérience. Elles représentent un écran coloré très homogène dans toutes ses parties, tant au point de vue de la teinte, qu'au point de vue de la cohésion de la matière; la feuille de gélatine est, en effet, très unie, et ne laisse apercevoir aucun trou ni aucune fissure par où pourrait passer un faisceau de lumière blanche. Les conditions expérimentales paraissent donc aussi bonnes que possible.

1^{re} Expérience

Elle fut faite dans les conditions suivantes : 12 ampoules ont été entourées respectivement avec des feuilles violet, bleu, vert, jaune, orangé et rouge. Deux ampoules ont été entourées de papier noir (papier d'emballage pour photographie). Deux ampoules furent laissées à la lumière, sans être enveloppées.

Toutes ces ampoules ont été posées à plat sur une table, en pleine lumière.

Le 26 novembre, c'est-à-dire 9 jours après le début de l'expérience, les deux ampoules restées sans enveloppement sont décolorées ; toutes les autres ont gardé sensiblement la même teinte.

On laisse tout dans le même état jusqu'au 23 décembre, c'est-à-dire pendant 28 jours. Voici les résultats obtenus après avoir libéré les ampoules de leurs enveloppes :

restées à la lumière	complètement décolorées	0
enveloppées de papier noir	ont gardé leur belle couleur jaune	+
— — violet	ont un peu pâli	+
— — bleu	décolorées	0
— — vert	encore jaunes	0
— — jaune	encore jaunes	0
— — orangé	jaune franc	+
— — rouge	jaune franc	+

Cette expérience indique donc que ce sont les rayons du spectre du côté du rouge, qui altèrent le moins le sérum, la décoloration commence à se faire sentir au jaune, s'accroît dans le vert, et est totale dans le bleu. En même temps, la réaction de la bilirubine se manifeste, comme on pouvait le prévoir, dans tous les sérums restés assez jaunes.

Il est assez remarquable que les rayons au delà du bleu, dans la région violette n'aient pas agi d'une façon plus intense. Cela tient peut-être à ce que la gélatine a été colorée par un violet très foncé, et que dans ce cas, l'opacité a peut-être été comparable à celle créée par un enveloppement au papier noir, qui, lui, s'est montré un conservateur parfait de la coloration.

2^e Expérience

La même expérience a été renouvelée le 10 janvier, avec les mêmes couleurs, plus l'indigo que je n'avais pas pu avoir lors de la première expérience.

Plusieurs ampoules ont été placées à la lumière, autant dans du papier noir, et autant dans chacune des gélatines colorées.

L'expérience est commencée le 10 janvier 1924. Le 25 du même mois, une série d'ampoules est libérée de ses enveloppes; voici le résultat :

restées à la lumière	décolorées
enveloppées de papier noir	jaune d'or
— violet	jaune
— indigo	jaune
— bleu	décoloré
— vert	très décoloré
— jaune	jaune
— orangé	jaune
— rouge	jaune

Les résultats sont donc exactement superposables à ceux de la première expérience.

L'action a été prolongée, et le 2 février, une autre série d'ampoules a été examinée. Dans le bleu, la décoloration est maximum; elle va en augmentant du rouge au bleu. Dans le rouge, il y a eu une légère action et l'indigo et le violet sont encore colorés.

Le 20 février, une autre série a été regardée, et on constate que la décoloration suit le même ordre, du rouge au bleu; mais, il y a un fait nouveau, c'est que la série des violets commence à se décolorer. Une autre série, retirée le 3 mars, donne les mêmes indications : maximum de décoloration dans le bleu, minimum dans la série rouge. L'hypothèse émise au début, à savoir que l'intensité de la teinte violette entraine pour quelque chose dans la conservation de la coloration, semble bien se vérifier, puisqu'une action prolongée finit par avoir raison de cette surcoloration.

Ce point me paraissant avoir besoin d'être éclairci, j'ai fait une nouvelle expérience.

3^e Expérience

Cette expérience a porté seulement sur les rayons violets, dans le but de disséquer leur action.

Dans une série de tubes Borrel, de même diamètre, je place 80 cc. d'eau; puis, dans chacun d'eux j'ajoute respectivement des quantités croissantes d'une solution mère saturée de violet de

gentiane. Une ampoule de sérum est placée dans chacun de ces verres. Des ampoules témoins sont placées l'une dans un verre vide, la seconde dans un verre contenant de l'eau pure et une troisième dans un verre contenant de l'encre noire. Tout le système est placé à la lumière du jour.

Voici le résultat après 7 jours d'exposition :

Verre 1, 1/4 de goutte de violet : violet très clair, décoloré.

Verre 2, 1/2 goutte de violet, violet très clair, décoloré.

Verre 3, 1 goutte de violet : violet très clair, décoloré.

Verre 4, 2 gouttes de violet : violet clair, décoloré.

Verre 5, 4 gouttes de violet : violet clair, décoloré.

Verre 6, 8 gouttes de violet : violet foncé, décoloré.

Verre 7, 16 gouttes de violet : violet foncé, décoloré.

Verre 8, 32 gouttes de violet : violet très foncé, moins décoloré.

Verre 9, témoin placé dans l'air, décoloré.

Verre 10, témoin placé dans l'eau, décoloré.

Verre 11, témoin placé dans de l'encre noire, jaune d'or.

Cette expérience est extrêmement démonstrative : elle confirme les précédentes et elle donne la signification exacte de l'influence des rayons violets. Ces rayons décolorent très rapidement le sérum.

Il faut que la teinte violette soit extrêmement foncée pour que l'action des rayons soit empêchée tout au moins momentanément. C'est ce qui s'était produit dans les deux premières expériences avec des gélatines trop colorées et entourant plusieurs fois l'ampoule..

Il n'y a donc plus de trou dans cette action des différentes radiations du spectre. La décoloration du sérum est minimum dans les radiations du côté rouge et elle va en augmentant dans la partie violette du spectre.

4^e Expérience

J'ai voulu vérifier une dernière fois cette influence des radiations lumineuses en opérant avec trois couleurs, en laissant de côté les couleurs complémentaires.

J'ai placé comme précédemment dans des vases Borrel une ampoule de sérum dans trois couleurs. J'ai fait trois solutions

aqueuses de carmin, de jaune de résorcine et de bleu de méthylène, ayant très sensiblement la même intensité colorante. Des témoins furent mis, l'un dans l'air, l'autre dans de l'encre noire. L'expérience, commencée le 14 février, donne les résultats suivants le 20, c'est-à-dire après six jours d'exposition à la lumière :

rouge carmin	jaune
jaune de résorcine	jaune
bleu de méthylène	décoloré
témoin dans l'air	décoloré
témoin dans l'encre	jaune

La question est donc parfaitement résolue expérimentalement.

La conclusion très ferme à tirer de cet ensemble d'expériences est que l'action décolorante de la lumière du jour est maximum dans la partie violette du spectre, et qu'elle va en diminuant au fur et à mesure qu'on va vers la partie rouge.

Action de la lumière électrique

Cette influence pouvant avoir un intérêt pratique considérable, j'ai tenu à déterminer si les rayons produits par les lampes à incandescence dont nous nous servons habituellement exerçaient leur action sur la coloration du sérum, et dans quelles limites, si cette action se manifestait.

Un appareillage de fortune, en fil de fer, fut monté devant une lampe de 50 bougies, de telle façon que 6 ampoules puissent tenir sur une ligne, face à la lampe et à 20 centimètres d'elle. Les expériences ont été faites la nuit, pour éliminer complètement l'action de la lumière diffuse. Après chaque exposition, les ampoules étaient enveloppées de papier noir et mises à l'obscurité. Un témoin, entouré de papier noir, fut gardé pour chaque opération.

La plus longue expérience a été poursuivie pendant 70 heures. Après ce temps d'exposition, la comparaison des ampoules exposées et du témoin a permis de voir qu'il n'y avait aucune différence appréciable. J'ai montré, plus haut, que la lumière du jour, agissant pendant 30 heures, changeait la coloration du sérum; une exposition à la lumière électrique pendant un temps double ne produit aucun changement. Je puis donc conclure que, pratiquement, la lumière électrique est sans action sur la coloration du sérum normal.

VI. — Influence des rayons ultra-violet sur la coloration du sérum

Pour ces expériences, la source de rayons utilisée a été un tube de quartz à vapeurs de mercure.

On sait que ces rayons ultra-violet, très réfringibles, et de très courtes longueurs d'ondes, ont des effets chimiques intenses. Il était donc à prévoir que leur action ne tarderait pas à se manifester sur la coloration du sérum. Leur propriété de traverser le quartz fondu et d'être arrêtés, au moins pour la plus grande partie, par le verre ordinaire, nous a conduits à réaliser les expériences suivantes :

1^{re} Expérience

Six tubes de quartz, de mêmes dimensions, sont remplis du même sérum, dont la coloration est d'un beau jaune d'or.

Un tube est conservé comme témoin, et les cinq autres sont soumis aux rayons pendant des temps variables, en évitant l'élévation de température de l'enceinte où ils sont placés. Voici le résultat :

		RÉACTION DE LA BILIRUBINE	
Témoin		jaune d'or	—
après 10 minutes de rayons X		»	+
— 15 —	—	très léger changement	+
— 20 —	—	le changement s'accroît	+
— 25 —	—	continue à s'accroître	+
— 30 —	—	très manifeste	+

Donc, après 30 minutes d'action, on a un changement de coloration manifeste, mais pas encore très fort ; la bilirubine ne paraît pas avoir subi de transformation.

2^e Expérience

Cette expérience est faite dans les mêmes conditions que la précédente, en commençant l'action pendant 30 minutes :

				RÉACTION DE LA BILIRUBINE
				—
Témoin		jaune d'or		+
après 30 minutes de rayons X		déjà décoloré		+ légère
— 40 —	—	la décoloration augmente		o
— 50 —	—	continue		o
— 60 —	—	décoloré		o

On voit que, dans l'expérience précédente, nous étions à la limite inférieure du temps d'action, puisque, à 40 minutes, il y a un changement tel que la bilirubine a disparu.

3^e Expérience

Dans cette expérience, j'ai soumis, pendant une heure aux rayons ultra-violetes le même sérum, placé dans des tubes de quartz et dans des tubes de verre.

		RÉACTION DE LA BILIRUBINE	VERRE	RÉACTION DE LA BILIRUBINE
QUARTZ		—	—	—
Témoin	jaune d'or	+	jaune d'or	+
1 ^{er} tube	décoloré	o	a pâli	+ légère
2 ^e —	décoloré	o	a pâli	+ légère
3 ^e —	décoloré	o	a pâli	+ légère

Cette expérience confirme bien la précédente en ce qui concerne la disparition de la bilirubine sous l'influence des rayons X. On voit aussi que le verre oppose une barrière à l'action de ces rayons, mais pas d'une façon absolue, puisque l'on note un léger changement dans la coloration. L'opposition absolue que nous relevons dans les teintes montre nettement l'action des rayons ultra-violetes sur la coloration du sérum normal.

Les rayons ultra-violetes agissent donc d'une façon très rapide sur la coloration du sérum en tubes de quartz, et ils ne sont pas sans influence sur du sérum placé en tubes de verre.

VII. — Influence de la chaleur sur la coloration du sérum

Il est un fait bien connu de tous ceux qui manipulent habituellement des sérums, c'est que lorsqu'on les chauffe, leur limpidité et leur transparence diminuent; ils finissent par devenir opaques, en même temps que leur teinte devient blanchâtre. Il existe à ce point de vue des différences assez sensibles suivant les animaux qui fournissent le sérum; d'autre part, suivant la température à laquelle on porte le sérum, les changements dans la coloration peuvent être plus ou moins brusques. Par exemple, lorsqu'on opère à des températures qui ne sont pas suffisantes pour obtenir la coagulation du sérum, celui-ci devient louche, augmente de consistance et finit par devenir d'une couleur blanche légèrement verdâtre. Ainsi que nous le verrons, ces changements s'accompagnent d'une modification dans la teneur en bilirubine.

1° Chauffage à 65°

Sérum initial	jaune d'or
après 10 minutes	léger changement de teinte
— 20 —	léger trouble
— 30 —	floculation au fond de l'ampoule; la teinte s'atténue
— 40 —	la floculation s'accroît; décoloration
— 50 —	floculation générale; décoloration
— 60 —	très décoloré, blanchâtre
— 120 —	transformé en gelée blanc jaunâtre

Une seconde expérience a été faite à la même température, en cherchant les variations avant 10 minutes et après 2 heures. La recherche de la bilirubine a été faite en même temps que l'observation, mais comme, à partir de 30 minutes, le sérum est presque

complètement coagulé, j'ai dû faire cette recherche en broyant le coagulum dans une petite quantité d'eau distillée, et en opérant sur le liquide.

Voici les résultats :

			RÉACTION DE LA BILIRUBINE
			—
Sérum initial	beau jaune d'or		+
après 2 minutes	beau jaune d'or		+
— 4 —	un peu plus pâle		+
— 6 —	pâlit		+
— 8 —	l'opalescence commence		+
— 10 —	opalescent, coagule		●
— 20 —	opalescent, presque coagulé		o
— 30 —	opalescent, complètement coagulé		o
— 40 —	le coagulum devient de plus en plus dur		o
— 50 —			o
— 60 —			o
— 70 —			o
— 80 —			o
— 90 —	coagulum dur		o
— 100 —	la teinte opalescente ne change plus		o
— 110 —			o
— 120 —			o
— 130 —			o
— 140 —			o
— 150 —			●
— 160 —			o

On voit donc que, à cette température, la disparition de la bilirubine coïncide presque avec la coagulation; il se produit donc, en même temps un changement d'état physique, une modification chimique et une variation dans la couleur.

Ces phénomènes sont assez brusques, en raison de la température élevée à laquelle est porté le sérum. En opérant à des températures moins hautes, on évitera la coagulation, et des changements de teinte seront plus lents à se manifester.

2° Chauffage à 60°

		RÉACTION DE LA BILIRUBINE	
Sérum initial	beau jauné d'or	—	—
après 2 minutes	—	+	+
— 4 —	—	+	+
— 6 —	—	+	+
— 8 —	—	+	+
— 10 —	—	+	+
— 15 —	léger trouble	+	+
— 20 —	le trouble augmente	+	+
— 25 —	—	+	+
— 30 —	—	+	+
— 35 —	opalescent, visqueux	+	+
— 40 —	—	+	+
— 45 —	l'opalescence augmente	+	+
— 50 —	avec la viscosité	+	+
— 55 —	—	+	+
— 60 —	presque pâteux	+	+

On n'obtient pas de coagulation après une heure de chauffage, et on constate encore, après ce temps, la présence de la bilirubine.

3° Chauffage à 55°

Sérum initial	beau jaune d'or
après 15 minutes	—
— 20 —	—
— 25 —	—
— 30 —	—
— 35 —	—
— 40 —	—
— 45 —	—
— 50 —	—
— 55 —	—
1 heure	—
— 1 — 15	—
— 1 — 30	—
— 1 — 45	—
— 2 —	—
— 3 — 15	—
— 2 — 30	—
— 2 — 45	—
— 3 —	—
— 3 — 30	—
— 4 —	—

— 4 —	30	léger changement
— 11 —	45	—
— 24 —		un peu plus blanc
— 36 —		blanchâtre
— 48 —		blanchâtre
— 96 —		blanc trouble un peu pâteux
— 10 jours		coagulation incomplète. aux 3/4.

Les changements sont donc peu sensibles et très longs à se produire, à cette température.

4° Chauffage à 30°

Nous avons cherché si des températures plus basses pouvaient avoir une action sur la coloration du sérum.

Une série de pipettes à boules, remplies du même sérum, sont mises à l'étuve à 30° le 18 décembre. Depuis cette date, une pipette est retirée chaque jour de la chambre chaude et placée à l'obscurité; l'action de la chaleur sera donc de plus en plus marquée de la première à la dernière pipette retirée le 31^e jour. Deux pipettes du même sérum sont conservées comme témoins et placées à l'obscurité, sans passer dans l'étuve.

Si l'on place toutes ces pipettes les unes à côté des autres, sur un fond de même coloration gris, on voit que, jusqu'au 6^e jour, il n'y a pas de changement appréciable dans la coloration. Mais, à partir du 6^e jour, la teinte jaune très accusée du sérum commence à pâlir, et l'action va en se continuant jusqu'au 31^e jour; le sérum pâlit et prend une teinte un peu verdâtre. *

A ce changement lent ne correspond aucune modification sensible de la bilirubine; au 31^e jour, on obtient encore la réaction, atténuée par rapport à celle du sérum témoin, mais elle existe encore. Il aurait fallu sans doute poursuivre plus longtemps l'action de la chaleur à cette température pour obtenir une oxydation complète de la bilirubine.

Dans une autre expérience, prolongée pendant deux mois, j'ai obtenu une décoloration complète du sérum. Déjà, au 27^e jour, le sérum était très décoloré, et il ne donnait plus la réaction de la bilirubine. Après deux mois, il était comme de l'eau teintée en jaune très clair, légèrement rosé. Ces différences tiennent évidemment à l'état initial du sérum au point de vue coloration.

5° Influence des chauffages successifs

Il nous a paru intéressant de mettre en évidence l'action des chauffages successifs, puisque cette pratique est courante lorsqu'on veut tyndalliser un sérum.

Nous avons opéré à la température classique de 56°, une heure chaque fois.

NOMBRE DE CHAUFFAGES	COLORATION	RÉACTION DE LA BILIRUBINE
1	jaune d'or	+
2	jaune d'or	+
3	commence à blanchir	+
4	devient un peu opalescent	+
5	opalescent	+
6	opalescent, sirupeux	+
7	opalescent, sirupeux	+
8	opalescent, sirupeux	+
9	opalescent, sirupeux	+
10	opalescent, sirupeux	+ légère
11	opalescent, s'épaissit	+ légère
12	opalescent, s'épaissit	+ légère
13	devient verdâtre	0

On voit donc que les changements de coloration sont assez lents à se produire dans ces conditions, et que la bilirubine persiste pendant longtemps; elle ne disparaît que lorsque le sérum devient verdâtre, et il faut pour cela 13 chauffages successifs d'une heure chacun.

Pratiquement deux ou trois tyndallisations à 56° ne changent pas, ou seulement d'une façon peu appréciable, la coloration du sérum.

J'ai opéré à une température plus basse, en prolongeant le nombre des chauffages successifs.

Le 22 février, 27 ampoules de sérum sont placées dans un bain-marie à 30°. Après une heure, on retire toutes les ampoules et elles sont toutes placées à l'obscurité. Lorsque les ampoules sont froides, on en remet 26 au bain-marie pendant une heure, la première étant conservée à l'obscurité. On les retire et on recommence ainsi de suite, en conservant à chaque fois une ampoule et en remettant le reste au bain-marie.

Dans ces conditions, les ampoules, au fur et à mesure qu'elles sont retirées ont subi 1, 2, 3, 4 26, 27 chauffages à 30°.

Lorsque la dernière ampoule, la 27^e, est retirée, on compare à la lumière toutes ces ampoules; on voit que le changement de coloration de la dernière ampoule avec la première et avec une ampoule témoin n'indique qu'un changement de coloration si peu important qu'on peut dire que, pratiquement, il n'y a eu aucune influence de ces chauffages successifs.

La réaction de l'acide nitrique montre que, dans cette dernière ampoule, la bilirubine existe encore, comme dans le témoin.

Les chauffages successifs à cette température sont donc sans aucune influence sur la coloration du sérum.

VIII. — Décoloration du sérum coagulé

Lorsque du sérum a été coagulé par la chaleur, on pourrait penser, à priori, que sa teinte ne doit plus varier, puisqu'elle a déjà varié dans de très grandes proportions depuis son état normal liquide jusqu'à son état de coagulum. Nous savons, en effet, qu'un sérum normal de belle teinte jaune pâlit si l'élévation de la température à laquelle il est porté est suffisante, et qu'il perd presque entièrement sa couleur. Je dis presque entièrement, car il garde encore une teinte jaune très faible, mais néanmoins sensible.

Si l'on porte rapidement du sérum en ampoules à 80°, en deux à trois minutes, le sérum se coagule en prenant une teinte blanche très légèrement jaunâtre; si on broie le coagulum avec de l'eau pour opérer la recherche de la bilirubine, on ne peut plus en mettre en évidence. Si on laisse ce sérum coagulé à la lumière, il blanchit de plus en plus, et la teinte jaunâtre disparaît. C'est ce que montre bien l'expérience suivante :

Le 26 janvier, je fais coaguler à 80° douze ampoules de sérum d'un beau jaune, qui donne, avant coagulation, la réaction de la bilirubine. Le sérum coagulé est jaune très clair, et la recherche de la bilirubine est négative. Dix de ces ampoules sont laissées à la lumière, et deux d'entre elles sont enveloppées de papier noir.

En examinant journellement les coagula exposés à la lumière, on voit qu'ils blanchissent de plus en plus. Le 20 février, toutes les ampoules de sérum coagulé sont devenues blanches, et les deux ampoules-témoins, enveloppées de papier noir, sont restées avec leur teinte jaunâtre du début de l'expérience.

Le fait que le sérum liquide contenait de la bilirubine est facile à mettre en évidence, l'autre fait que, dans le sérum coagulé, on ne la retrouve plus avec le même procédé, et enfin la constatation que le sérum blanchit permettent de croire que, sitôt après coagulation, il existait encore des traces indécélables de bilirubine qui lui donnaient une teinte jaunâtre. Cette bilirubine est difficile à mettre en évidence, par suite, sans doute, d'une nouvelle combinaison albumineuse dans laquelle elle serait entrée. Pour que cette bilirubine disparaisse par l'exposition à la lumière, il est nécessaire qu'elle existe à l'origine. Il n'est pas supposable qu'un séjour de deux à trois minutes au bain-marie à 80° ait eu le temps de la décomposer; il est plus logique d'admettre, étant donné ce que nous savons de son affinité pour l'albumine à froid, de penser qu'elle est retenue dans une nouvelle combinaison dont l'étude serait à faire.

Pour montrer l'influence de la lumière sur le sérum coagulé, on peut faire l'expérience suivante, assez amusante : on prend une ampoule de sérum coagulé, et, sitôt après la coagulation, on entoure l'ampoule de papier noir, collé sur le verre, en ménageant une ouverture qu'on expose à la lumière. On voit le sérum blanchir de plus en plus, et, si on gratte le papier du côté opposé de l'ampoule, on voit que le sérum est encore jaunâtre; la lumière ne traverse pas la masse du sérum coagulé. On pourrait faire une expérience intéressante pour savoir quelle épaisseur de sérum coagulé se laisse traverser pendant un temps donné.

IX. — Action de l'acide trichloracétique sur le sérum

A la séance de la Société de Pathologie Comparée du 12 juin 1922, MM. Medynski et Oliviero ont annoncé que, lorsqu'on ajoute de l'acide trichloracétique à du sérum de cheval,

il se forme « *un précipité blanc au début de la filtration, pour virer au bleu turquoise par la suite* ». Selon ces auteurs, cette coloration ne se produit avec aucun autre sérum et elle s'atténue avec le temps, de telle façon qu'il est possible de se rendre compte si un sérum est vieux ou frais.

Examinons les propositions énoncées.

1° L'acide trichloracétique donne un précipité coloré avec le sérum

Ce phénomène de coloration est connu depuis longtemps, bien avant que MM. Medynski et Oliviero s'en soient aperçus.

Voici textuellement ce que dit Fouchet à ce sujet en 1917.

« Nous appliquons pour la défécation du sérum la méthode de Moog, qui consiste, comme on le sait, à précipiter l'albumine du sérum par une solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100. Quand le précipité d'albumine est obtenu, en partant d'un sérum bien privé d'hémoglobine, il est souvent teinté en jaune, et cette coloration devient nettement verte au bout de quelques heures d'exposition à l'air. Il nous était permis de supposer que cette coloration était due à des pigments biliaires, ce qu'il nous a été facile de vérifier un grand nombre de fois en utilisant les réactions classiques de Gilbert ou de Grimbert. »

En remontant plus haut, nous lisons dans la thèse de Piettre de 1910 : « L'acide trichloracétique fondu au bain-marie dissout en vert la bilirubine.

La question est donc très nette; cette réaction soi-disant nouvelle était connue depuis longtemps.

MM. Medynski et Oliviero cherchent une explication à ce phénomène en disant qu'ils ont pensé au glycogène ou à des produits de sécrétion hépatique. On ne voit pas ce que vient faire le glycogène en cette affaire, mais, par contre, nous savons depuis longtemps que la réaction est une réaction des pigments biliaires. En fait, cette réaction est considérée par les chimistes comme une réaction de la bilirubine.

Il y a plus : ces auteurs considèrent la réaction comme constante avec le sérum de cheval. Cela n'est pas exact; Fouchet, dans le travail dont j'ai parlé plus haut, avait vu que, avec certains sérums incolores, la réaction n'existe pas. J'ai pu véri-

fier moi-même, sur un très grand nombre de sérums de chevaux que cette réaction n'est pas toujours constante; elle existe très souvent, mais parfois elle fait défaut.

2° La réaction s'atténue avec le temps

Ce que nous savons des divers agents physiques, agissant sur le sérum, nous explique parfaitement que cette réaction puisse s'atténuer.

Puisqu'il s'agit, en fait, d'une réaction de pigment biliaire, toute influence qui modifie la réaction de la bilirubine modifiera en même temps la réaction avec l'acide trichloracétique.

3° Il est possible de se rendre compte si un sérum est vieux ou frais

Il m'est absolument impossible de souscrire à cette proposition. Il faudrait, pour qu'elle ait une base apparente de vérité, que tous les sérums aient à l'origine la même coloration. Or, je viens de démontrer, au cours de ce travail, que la coloration du sérum change avec le même cheval, suivant, par exemple, le nombre de saignées qu'il a subies; un sérum peut parfaitement être très récent et être décoloré, au moment même de la récolte et, au contraire, un sérum très coloré à l'origine peut garder très très longtemps sa coloration s'il est conservé à l'abri absolu de la lumière. La proposition énoncée est donc fautive.

4° Cette coloration ne se produit pas avec d'autres sérums que celui du cheval

Cette proposition est incomplètement vraie. J'ai vérifié la réaction sur :

4	sérums de porc
6	— boeuf
5	— mouton
6	— lapin
4	— cobaye
8	— chien
2	— âne

Je n'ai jamais obtenu la réaction dans aucun cas.

Mais, avec 10 sérums de mulet, j'ai obtenu 10 fois la réaction.

Le sérum du mulet se conduit donc à cet égard comme celui du cheval.

En résumé, cette action de l'acide trichloracétique, presque constante chez le cheval, existe aussi chez le mulet, à l'exclusion des autres animaux examinés. Elle est le témoin de la présence de pigments biliaires, mais elle ne peut servir en aucun cas à diagnostiquer l'âge du sérum.

*
**

J'ai voulu vérifier, à titre de contrôle, comment se comporterait une solution de bilirubine pure, comparativement à du sérum.

J'ai fait une solution de bilirubine, dans la proportion où elle existe dans le sérum de cheval, c'est-à-dire une solution à environ 1 pour 8.000. Cette solution n'a pas tout à fait la teinte du sérum, mais l'intensité du jaune est sensiblement comparable.

Cette solution est mise dans des tubes de verre et placée à côté d'un nombre égal de tubes contenant du sérum. En même temps, le même nombre de tubes contenant la solution et du sérum est placé à l'obscurité, enveloppé de papier noir.

On voit la décoloration survenir peu à peu dans les deux séries de tubes placés à la lumière; au début, elle est plus marquée dans les tubes contenant le sérum.

Au bout de deux mois, le sérum et la bilirubine exposée à la lumière sont complètement incolores, alors que les tubes enveloppés de papier noir ont gardé leur coloration initiale.

Cette expérience, à elle seule, est une démonstration de tout ce qui a été vérifié au cours de ce travail.

Conclusions générales

1° La coloration du sérum normal de cheval est due à la présence de faibles quantités de bilirubine (1 gr. pour 7.950 centimètres cubes).

2° Lorsqu'un sérum est d'une belle teinte jaune, la bilirubine est mise facilement en évidence par la réaction de Hayem. Au fur et à mesure que la coloration devient plus pâle, la quantité de bilirubine diminue, et dans un sérum décoloré, il est impossible de la mettre en évidence.

3° La teinte du sérum d'un même animal devient plus pâle au cours de saignées successives.

4° Un sérum pâlit proportionnellement au temps écoulé depuis sa récolte, mais il pâlit d'autant moins qu'il avait une teinte plus accusée lors de son obtention.

5° La lumière est le facteur prépondérant de la décoloration du sérum; l'oxygène de l'air n'intervient que très faiblement dans ce phénomène.

6° L'action décolorante est maximum dans la partie bleue et violette du spectre; elle est minimum dans la partie jaune et rouge.

7° La lumière électrique paraît être sans influence sur le sérum.

8° Les rayons ultra-violets décolorent très rapidement le sérum.

9° La chaleur modifie la coloration d'autant plus vite que la température est plus élevée. Son influence se manifeste déjà à une température de 30°, mais seulement au bout de six jours.

10° L'influence des chauffages successifs à 55° est *pratiquement* sans influence sur la couleur du sérum, *dans les limites de temps où sont faites les tyndallisations.*

11° Le sérum coagulé, déjà décoloré par la chaleur, garde néanmoins une légère teinte jaune. Il continue à se décolorer sous l'influence de la lumière.

12° La réaction colorée du sérum traité par l'acide trichloracétique est due à la présence de pigments biliaires.

Cette réaction se produit très fréquemment, mais pas toujours, avec le sérum de cheval; on peut la mettre en évidence avec le sérum de mulet; elle n'existe pas avec les autres sérums d'âne, de bœuf, de mouton, de porc, de chien, de lapin et de cobaye.

Vu :

*Le Directeur de l'École
Nationale Vétérinaire de Lyon,*
F.-X. LESBRE.

Vu :

Le Doyen,
Jean LÉPINE.

Vu :

*Le Professeur de
l'École Vétérinaire de Lyon,*
J. BASSET.

Le Président de la thèse,
F. ARLOING.

Vu et permis d'imprimer :
Lyon, le 25 octobre 1924.

*Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,*
CAVALIER.

BIBLIOGRAPHIE

- A. AUCHE. — Recherche des pigments biliaires. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1908, pp. 297, 299.
- In thèse de Durroux. Le Sang des Equidés, note, p. 20.
- DAREMBERG. — La coloration du sérum sanguin normal. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1901, p. 1055.
- *Archives de médecine expérimentale*, 1^{er} nov. 1891, p. 723.
- DAREMBERG et SALET. — Article « sang », Dictionnaire de Chimie de WURTZ; Chimie physiologique d'A. GAUTIER.
- DOR. — Hyposérochromie et hypersérochromie. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1901, p. 1119.
- ERLICH. — Sulfodiazobenzol; ein Reagens auf Bilirubin. *Centralblat. f. klin. med.*, Leipzig, 1883, p. 721.
- FOUCHET. — Nouvelle méthode de recherche des pigments biliaires dans le sérum sanguin. *Comptes rendus de la Société de Biologie*, 1917, 10 nov., p. 826.
- GILBERT et HERSCHER. — Diminution de la coloration du sérum sanguin. *C. r. de la Soc. de Biologie*, 1901, p. 1000. Choléminimétrie, in *Traité du Sang*, t. II, p. 65.
- GILBERT, HERSCHER et POSTERNAK. — Sur la signification de l'anneau bleu produit par le réactif de Gmelin dans certains sérums (réaction de Hayem). *C. r. de la Société de Biologie*, 1903, p. 584.
- Sur la nature de la matière colorante du sérum et des épanchements séreux humains. *C. r. de la Soc. de Biologie*, 1905, 11 fév., p. 250.
- Sur un procédé de dosage de la bilirubine dans le sérum. *C. r. de la Soc. de Biologie*, 1903, p. 1587.
- Présentation d'un appareil pour doser la bilirubine dans le sérum sanguin. *C. r. de la Soc. de Biologie*, 1904, 30 avril, p. 700.

- GMELIN et TIEDEMAN. — Recherches exp. physiologiques et chimiques sur la digestion, trad. Jourdan, Paris, 1826.
- GRIGAUT. — Recherche de l'urobiline dans le sang et dans les humeurs de l'organisme. *C. r. de la Soc. de Biologie*, 1909, 8 mai, p. 725.
- GRIMBERT. — Recherche des pigments biliaires dans l'urine. *C. r. de la Soc. de Biologie*, t. LIX, 1905, p. 346. *J. de Pharm. et de Chimie*, XXII, 1905, p. 487.
- GRIMBERT et POIROT. — Recherche de l'urobiline dans le liquide duodénal. *C. r. de la Soc. de Biologie*, t. XC, 1924, 8 fév., p. 278.
- HAMMARSTEN. — Ein Beitrag zur Kenntniss der Menschengalle. *Jahresber. f. Tierchemie*, 1878, t. VIII, p. 263.
- Ueber das vorkommen von Gallenfarbstoff in dem Blutserum. *Maly's Jahresber.*, 1878, t. VIII, p. 129.
- Lehrbuch der physiologischen Chemie. Wiesbaden, 1899, p. 507.
- HEDENIUS. — Méthode zum Nachweise der Gallenfarbstoffe in ikterischen Flüssigkeiten. *Maly's Jahresb.*, 1894, p. 385.
- JAKSCH (Von). — Ueber eine methode zum Nachweise von Kleinem Mengen von Gallenfarbstoff im Blute. *Verhandl. d. cong. f. inner. med. Wiesbaden*, 1891, p. 353.
- JOLLES. — Beitrage zur Kenntniss der Galle und eine quantitative methode zur Bestimmung der Bilirubin in der menschlichen und thierischen Galle. *Pfluger's Arch.*, 1894, t. V, p. 1.
- *Arch. f. d. ges. Phys.*, t. LXV, LXVII, p. 446.
- LEPEHNE. — *Deutsche med. Wochen*, t. XLIX, n° 20, 18 mai 1923; Analyse in *Presse médicale*, 3 novembre 1923. n° 88, p. 119.
- MEDYNSKI et OLIVIERO. — Action de l'acide trichloracétique sur le sérum humain et sur le sérum d'animaux. *Bull. de la Soc. de Pathologie comparée*, n° 233, 21 juillet 1923, p. 495.

- MOREL et MONOD. — Technique très sensible pour la recherche de l'urobiline applicable à tout liquide, même au sérum. *C. r. de la Soc. de Biologie*, 1908, 8. févr., p. 119.
- PEASE H. and PEARCE R. — Liver necrosis and venous thrombosis in horses, actively immunized with diphteria and tetanus toxins and with streptococci and theirs products. *J. of infect. diseases*, 1906, t. III, p. 619-637.
- PETTIT A. et LOISEAU. — Réactions tissulaires chez des chevaux producteurs de sérums thérapeutiques. *C. r. Soc. de Biologie*, 16 mai 1908, p. 869.
- PIETTRE. — Recherches sur la bile. Thèse Paris, 1910, p. 194.
- RANC. — Extraction de la bilirubine du plasma du sang de cheval. *C. r. de la Soc. de Biologie*, 1907, 23 févr., p. 306.
- Sur la matière colorante du plasma du sang de cheval. *C. r. de la Société de Biologie*, 1907, 16 mars, p. 496.
- THUDICUM. — Ueber das Lutein und die spectrum gelbgefarbter organischen substanzen. *Cent. f. d. med. Wissen.*, 1869, t. VII, p. 1.
- SALSKOWSKI. — Die lehre vom Harn, Berlin, 1882, p. 245.
- STADELMANN. — Der Ikterus und seine verschiedenen formen. Stuttgart, 1891. Weitere Beitrage zur Lehre vom Ikterus. *Arch. f. exp. Pat. u. Phar.*, 1883, t. XVI, p. 128.
-



O. IMPRIMERIE O.
DE COSTER
11. RUE DE TANGER
PARIS
